

· 研究论文 ·

乙草胺和异丙草胺对映异构体的拆分

顾芳¹, 张晓翔^{1,2}, 夏婷婷¹, 陈景文¹, 蔡喜运^{*1}

(1. 大连理工大学 环境学院 工业生态与环境工程教育部重点实验室 辽宁 大连 116024;
2. 浙江建安检测研究院有限公司 卫生评价中心 杭州 310000)

摘要:利用 Chiralpak AS-H 手性色谱柱,以正己烷为流动相,以有机醇为极性改性剂,采用正相高效液相色谱法分别对乙草胺和异丙草胺的对映体进行了手性拆分,并结合紫外-可见、圆二色、旋光检测器和八区律规则对其对映体的绝对构型进行了判定。结果表明:乙草胺和异丙草胺的第一洗脱峰在 220 nm 检测波长下均具有负的康顿(Cotton)效应和旋光(ORD)信号,根据八区律判定其构型为 *aR*-型,具有相反信号的第二洗脱峰为 *aS*-型。以正己烷-异丙醇(97:3,体积比)为流动相时,乙草胺和异丙草胺分离度分别为 2.23 和 1.52。其手性拆分过程均受焓驱动,且分子中的 *N*-烷氧取代基在对映体与手性固定相作用过程中具有重要作用。

关键词:高效液相色谱;手性固定相;对映体拆分;乙草胺;异丙草胺

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2011.04.08

中图分类号:O685 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2011)04-0375-06

Enantiomeric resolution and thermodynamical mechanism of acetochlor and propisochlor

GU Fang¹, ZHANG Xiao-xiang^{1,2}, XIA Ting-ting¹, CHEN Jing-wen¹, CAI Xi-yun^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education/Department of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning Province, China;
2. Department of Health Evaluation, Zhejiang Guian Test Institute CO., LTD Hangzhou 310000, China)

Abstract: The enantiomers of acetochlor and propisochlor were separated using high performance liquid chromatography with a Chiralpak AS-H column. The mobile phase was *n*-hexane with organic alcohols as polar modifiers. Absolute configurations of the enantiomers were identified by a combination of UV-Vis, Circular Dichroism, ORD detector and the octant rule. The results showed that the first eluted peak for both acetochlor and propisochlor had the negative cotton effect and showed (-) ORD signal at 220 nm corresponded to *aR*-isomer. Baseline enantiomeric separation of acetochlor and propisochlor was achieved with mobile phase of *n*-hexane-isopropyl alcohol (97:3 by volume). Moreover, the enantiomeric resolution was controlled by enthalpy term, in which the *N*-alkoxyalkyl substituents played important roles.

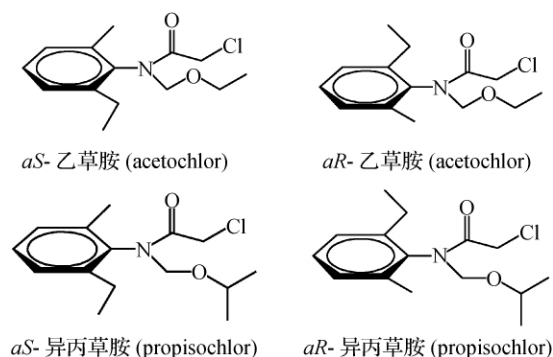
Key words: high performance liquid chromatography; chiral stationary phase; enantiomeric resolution; acetochlor; propisochlor

收稿日期:2010-12-10;修回日期:2011-05-03.

作者简介:顾芳(1987-),女,湖北仙桃人,硕士研究生,*通讯作者(Author for correspondence):蔡喜运(1978-),男,山东菏泽人,博士,副教授,主要从事农药环境化学研究,电话:0411-84707844, E-mail: xiyuncai@dlut.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(20707002);霍英东教育基金(114042)资助项目。

乙草胺和异丙草胺是酰胺类具有代表性的除草剂品种,主要用于玉米、大豆等作物中杂草的防除,其主要作用机制是抑制杂草发芽种子中蛋白质的合成^[1-2]。在其分子结构中,由于C_{Ar}-N上的不对称取代而各存在一对对映体(见Scheme 1)。手性农药对映体具有相同的理化性质,但通常有着不同的生物活性及环境行为,包括毒理、降解及代谢等^[3-4]。



Scheme 1

手性固定相色谱法是拆分手性农药的主要手段之一,应用十分广泛^[5-7]。目前乙草胺对映体拆分的方法主要有气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)。王鹏等^[8]以纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)为手性固定相(CDMPC-CSP),在正相HPLC上拆分了乙草胺对映体,其分离度为1.17; Tian等^[9]分别采用自制CDMPC-CSP和直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(ADMPC-CSP)对乙草胺对映异构体进行了拆分,但未能得到分离趋势; Müller等^[10]采用手性OV1701-BSCD气相色谱柱拆分乙草胺对映体得到了并肩峰,以手性Chiracel OD-RH柱作为固定相,在反相HPLC上拆分时其分离度为0.2。而目前有关异丙草胺对映体的拆分研究,还鲜有报道。

本研究采用正相HPLC,通过筛选手性色谱柱和流动相,对乙草胺和异丙草胺对映体实现了基线分离,并联合圆二色检测器和八区律判定了对映体的绝对构型。考察了流动相中各种改性剂对拆分的影响及温度(5~45℃)对对映体色谱保留和分离的影响,并探讨了其热力学机理。

1 材料与方 法

1.1 药剂和试剂

外消旋乙草胺(acetochlor)和异丙草胺(propisochlor)原药(含量分别为95.2%和89.7%)

(山东滨农科技有限公司),以正己烷-异丙醇(50:50,体积比)配制标准溶液。正己烷和极性改性剂乙醇、异丙醇、丙醇和丁醇(色谱纯,美国Tedia公司)。

1.2 仪器

手性拆分及热力学实验在大连中汇达公司的液相色谱系统中完成,该系统由LC10P高压液相恒流泵、LC10UV紫外可见光检测器、KT-230A色谱柱温箱(大连中汇达科学仪器有限公司)、7725i手动进样阀(20 μL)(Rheodyne,美国)及N2000色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司)组成;圆二色(CD)及旋光光谱的检测是在LC2000高效液相色谱系统(日本JASCO公司)上进行停泵扫描,该系统配备PU-2089四元梯度泵、AS-2055自动进样器、CO-2060柱温控制系统、UV-2075紫外检测器、CD-2095圆二色检测器、OR-2090旋光检测器、LC-Net II/ADC数据采集器和ChromPass色谱工作站,检测波长为220 nm; Chiralpak AS-H手性色谱柱(日本Daicel化学工业公司)25 cm × 4.6 mm(*i. d.*),粒径5 μm。

1.3 实验方法

利用一系列手性色谱柱,在流动相流速为1.0 mL/min下,以正己烷为流动相,其中添加有甲醇为极性改性剂(正己烷与醇的体积比为97:3),根据色谱分离情况,选择最佳极性改性剂。

在流动相为正己烷-异丙醇(97:3,体积比)、流速1.0 mL/min、柱温25℃时,分别对乙草胺和异丙草胺的洗脱峰进行圆二色谱扫描,波长范围为210~420 nm,步长为2 nm。结合经验八区律规则,判断其对映体的绝对构型。

在最优色谱条件下,分别在不同柱温下对乙草胺和异丙草胺的对映体进行拆分,并探讨对映体拆分的热力学机制。

1.4 色谱条件和色谱参数计算

色谱柱死时间 t_0 是指不被色谱柱吸附的惰性物质的出峰时间,用正己烷进行测定。第一和第二洗脱峰的保留因子分别为 $k_1 = (t_1 - t_0) / t_0$ 和 $k_2 = (t_2 - t_0) / t_0$;分离因子 $\alpha = k_2 / k_1$;分离度 $Rs = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ 。其中 t_1 和 t_2 分别为第一和第二个洗脱峰的保留时间; W_1 和 W_2 分别是第一和第二个洗脱峰的基线峰宽。

2 结果与讨论

2.1 化合物的手性分离及构型判定

通过一系列手性色谱柱的筛选及分离条件的优

化,乙草胺和异丙草胺在手性 Chiralpak AS-H 柱上,以正己烷-异丙醇(97:3,体积比)为流动相,流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 °C,进样量为 20 μ L,检测波长为 220 nm 时,可实现基线分离,分离度分别为 2.23 和 1.52,色谱图见图 1。

以乙草胺为例,应用经验规则八区律^[11]并结合 CD 图判断其构型:将乙草胺分子按以 C=O 键中心为原点的坐标放好,分别用 xy 、 xz 、 yz 3 个平面隔开,共产生 8 个空间。从一侧来看, xy 平面后方的 4 个空间称为后 8 区, xy 平面前方的 4 个空间称为前 8 区。一般只考虑后 8 区:在第一洗脱峰对应的对映体中,与生色团 C=O 相连的 $-CH_2Cl$ 位于正区,而 N -烷氧基在负区,考虑二者与生色团的距离,两者的取代效应基本可以相互抵消;对康顿(Cotton)贡献较大的芳基及其邻位烷基取代均位于负区,使得该对映体呈负的康顿效应,结合其 CD 图(见图 2)判定其绝对构型为 aR -型;具有相反信号的第二洗脱峰为 aS -型。异丙草胺对映体构型的判定方法同上,呈负康顿效应的第一洗脱峰为 aR -型对映体,第二洗脱峰为 aS -型对映体。待测化合物对映体的 CD 和旋光(ORD)正负信号一致,其绝对构型的判定结果与 Müller 等^[12]基于旋光测定法对异丙草

胺构型的判定结果一致。

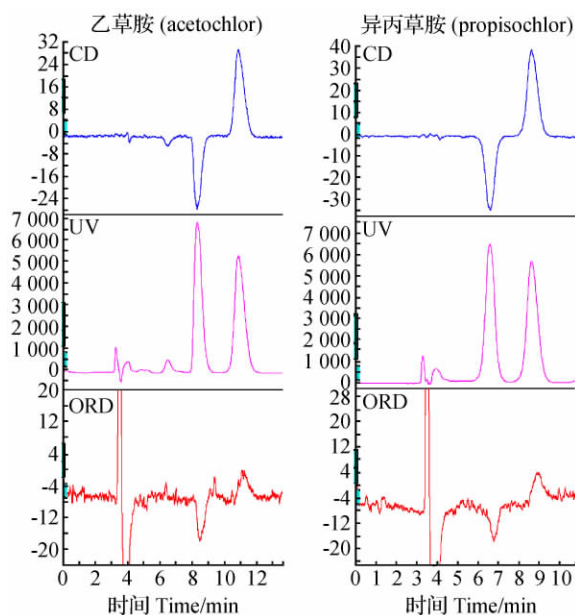


图 1 乙草胺和异丙草胺手性液相色谱分离圆二色(CD)、紫外(UV)及旋光(ORD)谱图
Fig.1 CD,UV and ORD of acetochlor and propisochlor enantiomers on normal phase HPLC

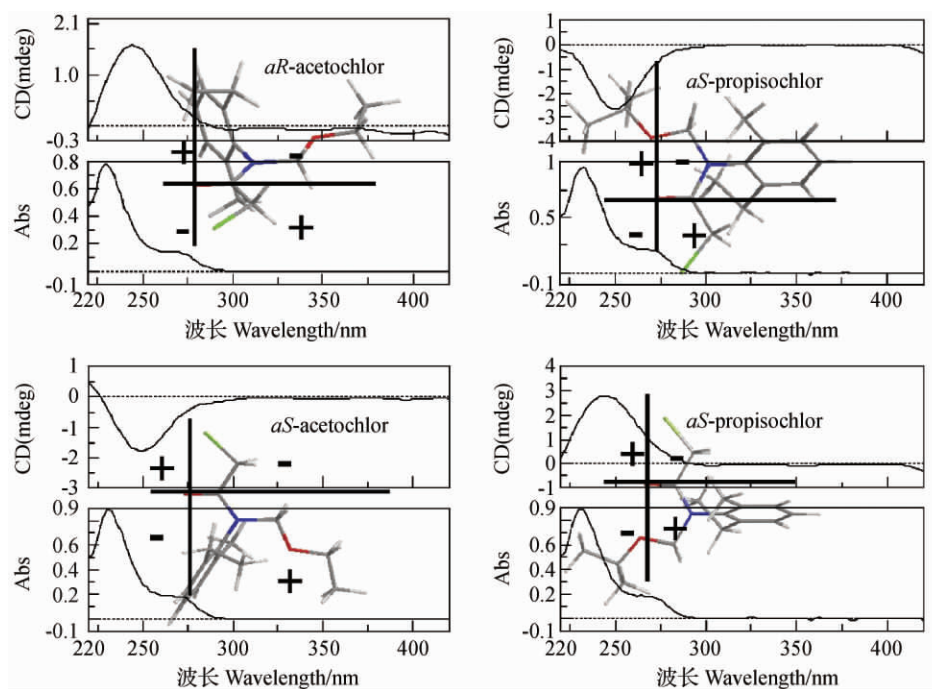


图 2 乙草胺和异丙草胺的圆二色谱图及八区律应用

Fig.2 CD spectra of acetochlor and propisochlor and their application in the octant rule

2.2 流动相中醇改性剂对拆分效果的影响
结果列于表 1。乙草胺对映体在不同流动相下

出峰顺序一致;而异丙草胺在以乙醇为改性剂的流动相中,其对映体出峰顺序逆转,其原因可能是由于

流动相中的乙醇导致了异丙草胺与手性固定相构象的改变,或使得固定相的手性空腔的立体环境发生了变化^[13-14]。

两个化合物对映体的保留因子(k)和分离因子(α)均随流动相中极性组份的不同而变化,按异丙醇、正丁醇、正丙醇、乙醇的顺序逐渐减小(表1),表明影响拆分效果的除了流动相的极性外还有醇分子的立体位阻效应。随着醇碳链的增长分离效果提高,其原因可能是碳链的增长相应地增大了位阻效

应,减弱了对映体分子从固定相的手性空穴上洗脱下来的能力,导致其保留时间延长,增大了对映体分子拆分的可能性^[15-16];而异丙醇由于其支链结构导致空间位阻的增加,溶质的保留因子、分离因子和分离度增大;同时,醇的极性越大,醇分子与手性固定相的作用越强,洗脱能力越强,导致对映体在固定相上的保留时间越短,拆分能力越差。由于乙醇的极性强于其他3种醇^[17],故其洗脱能力强,保留时间短,分离效果较差。

表1 醇改性剂对乙草胺和异丙草胺手性拆分的影响

Table 1 Effects of alcohols on the chiral separation of acetochlor and propisochlor

化合物 Compounds	改性剂 Modifier	保留因子 k_1	保留因子 k_2	分离因子 α	分离度 R_s
乙草胺 acetochlor	乙醇 ethanol	0.87	1.14	1.30	1.39
	异丙醇 isopropyl alcohol	1.74	2.65	1.52	2.23
	丙醇 propanol	0.90	1.31	1.46	2.03
	丁醇 butanol	1.05	1.57	1.50	2.47
异丙草胺 propisochlor	乙醇 ethanol	0.84	0.81	0.97	-0.22 ^a
	异丙醇 isopropyl alcohol	1.04	1.69	1.62	1.52
	丙醇 propanol	0.84	0.88	1.05	0.41
	丁醇 butanol	1.00	1.08	1.08	0.63

注(Note): 温度(temperature): 25 °C; 流速(flow rate): 1.0 mL/min; 手性固定相(CSP): Chiralpak AS-HL; 流动相(mobile phase): 正己烷-异丙醇(hexane-isopropyl alcohol) = (97:3, V/V); 检测波长(detected wavelength): 220 nm. ^a洗脱峰发生逆转(eluted with a reversed order)。

分离效果以具有支链结构的异丙醇为最优,可能是由于其结构改变了待分离物和手性槽穴周围的环境,也可能其与被分离物和手性固定相都有一定的结合作用^[16,18]。因此,极性改性剂对分离的影响并不完全来源于其极性,其空间结构也对手性分离有着不同程度的影响。

2.3 温度对拆分效果的影响

手性拆分时,其柱温对保留因子、分离因子、分离度及柱效等有明显影响。根据色谱分离原理,待测组份的色谱参数与温度的关系可用方程(1)和(2)表示^[19-21]。

$$\ln k = \frac{-\Delta G^0}{RT} + \ln \phi = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad (1)$$

$$\ln \alpha = \frac{-\Delta(\Delta H^0)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R} \quad (2)$$

其中 k 为保留因子, α 为分离因子, ϕ 为相比, ΔH^0 和 ΔS^0 为待测组份与固定相作用的焓变和熵变, $\Delta(\Delta H^0)$ 和 $\Delta(\Delta S^0)$ 分别为两个对映体的焓变和熵变之差。测定结果表明,两种化合物对映体的 k 和 α 均随温度的升高而减小。其 $\ln \alpha - 1/T$ 和 $\ln k - 1/T$ 都呈良好的线性关系 ($R^2 > 0.95$) (图3、图4),表明在所考察的温度范围内,柱温的变化不影响对映体

与手性固定相的相互作用机理^[21]。

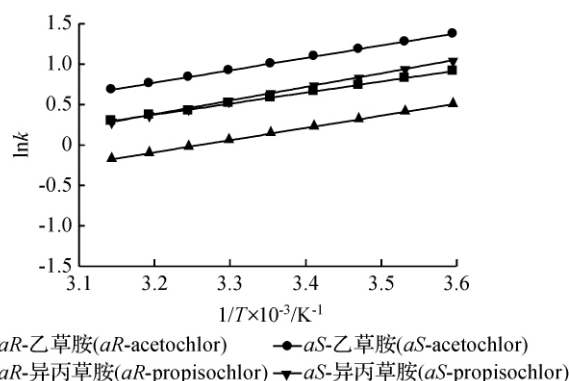


图3 乙草胺和异丙草胺 Van't Hoff $\ln k - 1/T$ 曲线图
Fig. 3 Van't Hoff $\ln k - 1/T$ plot of acetochlor and propisochlor

由图5可看出:待测物对映体的分离度(R_s)在考察温度范围内具有一定变化,这是由于随着温度的升高,色谱峰宽(W_1, W_2)逐渐变窄,拖尾现象减缓,而两对映体的出峰时间间隔($\Delta t = t_2 - t_1$)却有所减小所致。其中,当柱温为35 °C时, Δt 大幅度减小,而峰宽(W_1, W_2)并没有明显变化(表2),使得在35 °C时对映体分离度明显降低。

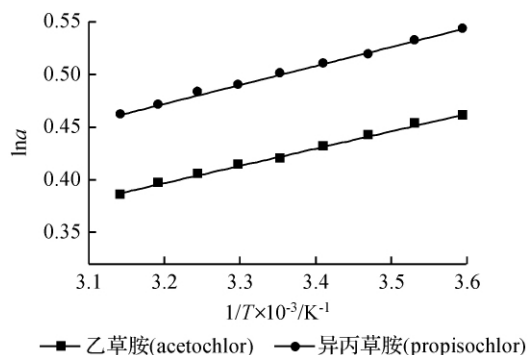


图4 乙草胺和异丙草胺 Van't Hoff $\ln \alpha - 1/T$ 曲线图
Fig. 4 Van't Hoff $\ln \alpha - 1/T$ plot of acetochlor and propisochlor

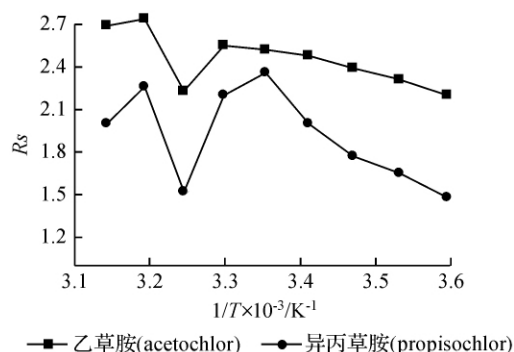


图5 温度对乙草胺和异丙草胺对映体分离度的影响
Fig. 5 Effect of temperature on the resolution (R_s) for acetochlor and propisochlor enantiomers

两种化合物的 $\Delta(\Delta H^0)$ 和 $\Delta(\Delta S^0)$ 均为负值(表3) 揭示了其手性拆分过程受焓控制。乙草胺和异丙草胺的 $\Delta(\Delta H^0)$ 都较大,说明其对映体在该柱上的拆分具有很好的可行性。相同色谱条件下比较对映体的焓变差和熵变差,乙草胺明显大于异丙草胺,说明乙草胺对映体较异丙草胺对映体与手性固定相的作用强,且更充分地利用了手性固定相分子内的

表3 乙草胺和异丙草胺对映体分离的热力学数据

Table 3 Thermodynamic data obtained for the chiral separation of acetochlor and propisochlor

化合物 Compound	ΔH^{0a} / (kJ/mol)	ΔH^{0b} / (kJ/mol)	$\Delta(\Delta H^0)$ / (kJ/mol)	$\Delta(\Delta S^0)$ / (J/(K · mol))	$\Delta(\Delta G^0)^{293.15}$ / (kJ/mol)	Q^c
乙草胺 acetochlor	-11.32	-12.73	-1.41	-1.11	-1.09	4.33
异丙草胺 propisochlor	-12.54	-13.28	-0.74	-0.78	-0.53	3.24

^a aR -对映体(enantiomer) ^b aS -对映体(enantiomer); ^c $Q = \Delta(\Delta H^0) / (\Delta(\Delta S^0) \times 293.15 \text{ K})$.

3 结论

乙草胺和异丙草胺在手性 Chiralpak AS-H 柱上均实现了基线分离,综合考虑对映体在手性色谱柱

表2 温度对乙草胺和异丙草胺对映体峰宽及出峰时间间隔的影响

Table 2 Effects of temperature on the width and interval time of peaks of acetochlor and propisochlor

化合物 Compound	柱温 Temperature / °C	峰宽 W_1	峰宽 W_2	出峰时间间隔 $t_2 - t_1$
乙草胺 acetochlor	5	1.72	2.01	5.04
	10	1.51	1.87	4.75
	15	1.40	1.80	4.02
	20	1.12	1.78	3.97
	25	1.12	1.69	3.13
	30	0.88	1.55	3.10
	35	0.87	1.33	2.77
	40	0.85	1.16	2.50
	45	0.74	0.63	0.75
	异丙草胺 propisochlor	5	1.38	1.96
10		1.33	1.87	4.03
15		1.29	1.80	3.77
20		1.25	1.79	3.12
25		1.19	1.76	2.25
30		0.90	1.35	2.47
35		0.78	1.08	2.20
40		0.80	1.18	1.98
45		0.69	1.05	1.54

注(Note): 流动相(mobile phase): 正己烷-异丙醇(hexane-isopropyl alcohol) = (97:3, V/V) 流速(flow rate): 1.0 mL/min, 色谱柱(CSP): Chiralpak AS-H 检测波长(detection wavelength): 220 nm.

空穴^[22]。这可能是由于异丙草胺中的 N -烷氧取代基中的支链烷基导致其相邻的氧原子吸电子能力较弱,也可能是其支链结构导致的空间位阻使得与手性固定相作用时形成非共价键的能力也相应较弱。通过考察焓对熵在 $\Delta(\Delta G^0)$ 中的相对贡献 Q 值^[23], 进一步表明了分子结构中的 N -烷氧取代基在对映体与手性固定相作用过程中起着重要作用。

上的保留时间和拆分效果,其最佳分离条件为:以正己烷-异丙醇(97:3,体积比)为流动相,柱温 25 °C,流速 1.0 mL/min,检测波长为 220 nm。对映体洗脱顺序均为 aR -和 aS -型对映体。极性改性剂对分

离效果的影响依赖于其极性及其空间结构。在实验温度范围内,手性拆分过程受焓控制,且不同的 *N*-烷氧取代基可导致对映体与手性固定相作用的差异。

参考文献:

- [1] HUA Ri-mao(花日茂), YUE Yong-de(岳永德), FAN De-fang(樊德方). 乙草胺在水中的光化学降解[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报) 2000, 3(1): 71-74.
- [2] WANG Xian-feng(王险峰), GUANG Cheng-hong(关成宏). 异丙草胺使用技术[J]. *Chin J Pestic* (农药) 2000, 39(6): 39-40.
- [3] WANG Y S, TAI K T, YEN J H. Separation, bioactivity, and dissipation of enantiomers of the organophosphorus insecticide fenamiphos[J]. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004, 57(3): 346-353.
- [4] SANCHEZ-RASERO F, MATALLO M B, DIOS G, et al. Simultaneous determination and enantiomeric resolution of mecoprop and dichlorprop in soil samples by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A* 1998, 799(1-2): 355-360.
- [5] QIU Jing(邱静), LI Li(李莉), ZHOU Zhi-qiang(周志强). 高效液相色谱对氯氟吡乙酸-1-甲基庚酯对映体的拆分[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报) 2002, 4(2): 67-70.
- [6] YANG Li(杨丽), JIANG Shu-ren(江树人), LIAO Yong(廖勇) et al. 流动相添加剂法与手性固定相对己唑醇光学异构体的拆分[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报) 2004, 6(2): 90-92.
- [7] YANG Li-ping(杨丽萍), LI Shu-zheng(李树正), LI Yu-chang(李煜昶) et al. 三种三唑类杀菌剂对映体生物活性的研究[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报) 2002, 4(2): 67-70.
- [8] WANG Peng(王鹏), JIANG Shu-ren(江树人), ZHOU Zhi-qiang(周志强) et al. 乙草胺的对映体识别[J]. *Chin J Pestic* (农药) 2005, 44(3): 113-114.
- [9] TIAN Q, LÜ C G, ZHOU Z Q et al. Enantiomeric separation of chiral pesticides by high performance liquid chromatography on cellulose tris-3,5-dimethyl carbamate stationary phase under reversed phase conditions[J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(3): 310-321.
- [10] MÜLLER M D, BUSER H R. Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers[J]. *Enviro Sci Technol* 1995, 29(8): 2023-2030.
- [11] LIGHTNER D A. Determination of absolute configuration by CD. Applications of the octant rule and the exciton chirality rule[J]. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 1994, 14: 131-174.
- [12] MÜLLER M D, POIGER T, BUSER H R. Isolation and identification of the metolachlor stereoisomers using high-performance liquid chromatography, polarimetric measurements, and enantioselective gas chromatography[J]. *J Agric Food Chem* 2001, 49(1): 42-49.
- [13] WANG T, ROBERT M, WENSLOW J. Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase[J]. *J Chromatogr A* 2003, 1015(1-2): 99-110.
- [14] OKAMOTO M. Reversal of elution order during the chiral separation in high performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal* 2002, 27(3-4): 401-407.
- [15] CHEN Ping(陈平), NA Peng-jun(纳鹏君), HAN Xiao-qian(韩小茜) et al. 禾草灵对映异构体在高效液相色谱手性固定相上的拆分[J]. *Chin J Inst Anal* (分析测试学报) 2003, 5(3): 39-41.
- [16] WANG Peng(王鹏), JIANG Shu-ren(江树人), FENG Nan(冯楠) et al. 醇改良剂对两种手性农药对映体拆分的影响[J]. *Chin J Inst Anal* (分析测试学报) 2005, 9(5): 104-106.
- [17] SUN Yu-qing(孙毓庆), HU Yu-zhu(胡育筑). HPLC Solvent System to Choose and Optimization(液相色谱溶剂系统地选择与优化) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社) 2008.
- [18] WANG P, JIANG S R, ZHOU Z Q et al. Enantiomeric resolution of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography[J]. *J Agric Food Chem* 2006, 54(5): 1577-1583.
- [19] ZHOU Ying(周瑛), ZHANG Shi-hao(张世浩), LIU Wei-ping(刘维屏) et al. 敌草胺对映体的高效液相色谱分离及手性拆分热力学研究[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报) 2006, 8(3): 260-294.
- [20] BERTHOD A. Chiral recognition mechanisms[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(7): 2093-2099.
- [21] O'BRIEN T, CROCKER L, THOMPSON R, et al. Mechanistic aspects of chiral discrimination on modified cellulose[J]. *Anal Chem* 1997, 69(11): 1999-2007.
- [22] HOU Jing-guo(侯经国), MEN Xiao-rong(孟晓荣), HE Tian-xi(何天稀) et al. 农药甲霜灵对映体的高效液相色谱分离及手性拆分热力学研究[J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学) 2003, 31(3): 307-310.
- [23] OBERLEITNER W R, MAIER N M, LINDNER W. Enantioseparation of various amino acid derivations on a quinine based chiral anion-exchange selector at variable temperature conditions[J]. *J Chromatogr A* 2002, 960(1-2): 97-108.

(责任编辑: 金淑惠)